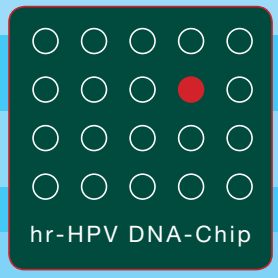


PapilloCheck® high-risk

Notice d'utilisation

Kit de diagnostic pour le génotypage des papillomavirus humain de type 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66 et 68 dans des frottis du col de l'utérus

RÉF 505 060

Pour usage diagnostique in-vitro par le personnel de laboratoire qualifié exclusivement

Révision : BQ-065-01
Août 2011

Greiner Bio-One GmbH
Maybachstr. 2 • 72636 Frickenhausen • Allemagne
Tél. : +49 (0) 7022 948-0 • Fax +49 (0) 7022 948-514
info@de.gbo.com • www.gbo.com/bioscience

greiner bio-one

EXPLICATION DES SYMBOLES

en	Store in the dark	Use by	Consult Instructions For Use	Catalog Number	Manufacturer	In Vitro Dianostic Medical Device	Temperature limitation	contains sufficient for <n> tests	Irritant	Batch code	Important Note
de	Im Dunkeln lagern	Mindestens haltbar bis	Vor Gebrauch Anweisung lesen	Katalognummer	Hersteller	In-Vitro-Diagnostika Medizinprodukt	Temperaturbegrenzung	Inhalt ausreichend für <n> Tests	Reizend	Chargenbezeichnung	Wichtiger Hinweis
fr	À stocker à l'abri de la lumière	Date limite de conservation	Lire le manuel avant utilisation	Numéro de référence	Fabricant	Produit médical de diagnostic in-vitro	Limite de température	Contenu suffisant pour <n> tests	Irritant	Numéro de lot	Note importante
es	Conservar en un lugar oscuro	A utilizar preferiblemente antes de	Antes de usar, lea las instrucciones	Número de catálogo	Fabricante	Producto medicinal de diagnóstica in vitro	Limitación de temperatura	Contenido suficiente para <n> ensayos	irritante	Código de lote	Nota importante
it	Conservare al buio	Da utilizzare entro e non oltre	Leggere le istruzioni prima dell'uso	Numero catalogo	Produttore	Dispositivo medico-diagnostico in-vitro	Limitazione temperatura	Contenuto sufficiente per test <n>	Irritante	Codice del lotto	Nota importante
pt	Conservar num local escuro	A utilizar de preferência antes de	Antes de usar, leia as Instruções	Número de catálogo	Fabricante	Dispositivo médico de diagnóstico *in vitro*	Limitação de temperatura	Conteúdo suficiente para <n> ensaios	Irritante	Código do lote	Aviso importante
nl	Donker bewaren	Tenminste houdbaar tot	Gebruiksaanwijzing lezen	Catalogusnummer	Fabrikant	In vitro diagnostisch medisch product	Temperatuurbeperking	Voldoende inhoud voor <n> tests	Irriterend	Lot nummer	Belangrijke opmerking
da	Opbevares mørkt	Anvendes senest	Læs brugsanvisningen	Katalognummer	Producent	In vitro meskdicin doagnose-apparat	Temperaturbegrænsær	Indeholder nok til <n> test	Lokalirriterende	Lotnummer	Vigtig henvisning
sv	Förvaras mörkt.	Sista förbrukningsdag	Läs bruksanvisningen före användning	Katalognummer	Tillverkare	In vitro-medicinsk doagnostisk apparatur	Temperatur-begränsning	Innehållet räcker till <n> tester	irriterande	Lot nummer	Viktigt meddelande
pl	Przechowywa ć w ciemności	Termin zydatności	Przed użyciem przeczytać instrukcję	Numer katalogowy	Producent	Diagnostyka in vitro Produktyw	Ograniczenie temperatury	Zawartość wystarcza na <n> testów	drażniący	Kod partii	Ważne
no	Oppbevares mørkt	holdbar til	Les bruksanvisning før bruk	katalognummer	produsent	in vitro-diagnostisk medisinsk utstyr	temperaturbegrensning	Innhold tilstrekkelig for <n> tester	irriterende	batch nr.	Viktig merknad
el	Αποθηκεύεται στα σκοτεινά	το λιγότερο διατηρείται	πριν την χρήση διαβάστε τις οδηγίες	Αριθμός Καταλόγου	Παραγωγός	In vitro διαγνωστικά ιατρικά προϊόντα	περιορισμός θερμοκραοίας	Περιεχόμενο αροκετό για <n> τεοτ	ερεθιστικό	κωδικός παρτίδας	Σημαντική υπόδειξη
tr	Karanlık yerde saklayınız	Son kullanma tarihi:	Kullanmadan önce talimatı okuyun	Katalog numarası	Üretici firma	In vitro diagnostik tıbbi tanı ürünü	Sıcaklık sınırlaması	İçeriği <n> test için yeterlidir	Tahriş edici	Parti kodu	Önemli Not

TABLE OF CONTENTS

1. COMPOSITION DU KIT 5

2. CONSOMMABLES, ÉQUIPEMENT ET MATÉRIEL REQUIS 6

3. EXPÉDITION ET STOCKAGE 8

4. CONSIGNES DE SÉCURITÉ 8

5. ÉLIMINATION DES DÉCHETS 9

6. INTRODUCTION 10

6.1 Destination 10
6.2 Types HPV détectables avec PapillOCheck® high-risk 10
6.3 Principe du test 11
6.4 Conception de la puce ADN PapillOCheck® high-risk 13
6.4.1 Design de la puce PapilloCheck® high-risk 13
6.4.2 Contrôles sur puce 14

7. CONDITIONS GÉNÉRALES DE TRAVAIL AVEC PAPILLOCHECK® HIGH-RISK 15

7.1 Instructions générales 15
7.2 Séparation des salles 15
7.3 Avertissements et précautions 16
7.3.1 Prévention de la contamination 16
7.3.2 Instructions pour la manipulation des puces ADN 16
7.3.3 Précautions générales 16
7.3.4 Travailler en toute sécurité 17

8. PROCÉDURE PAPILLOCHECK® HIGH-RISK 18

8.1 Prélèvement d'échantillon et extraction d'ADN 18
8.1.1 Prélèvement d'échantillon 18
8.1.2 Extraction d'ADN 20
8.2 Réaction en chaîne par polymérase (PCR) 21
8.2.1 Configuration du thermocycleur 21
8.2.2 Traitement par uracil-N-Glycosylase (UNG) 22
8.2.3 Préparation de la PCR 23
8.3 Hybridation et lavage 25
8.3.1 Préparation et mise en place 25
8.3.2 Hybridation 27
8.3.3 Lavage et séchage 29
8.4 Lecture et évaluation de la puce PapillOCheck® high-risk 31

9. DÉPANNAGE 32

10. ASSISTANCE TECHNIQUE 33

11. CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE DE PAPILLOCHECK® HIGH-RISK..... 34

11.1 Performance analytique de PapillOCheck® high-risk 34
11.1.1 Sensibilité analytique 34
11.1.2 Spécificité analytique – Types HPV 35
11.1.3 Spécificité analytique – Organismes non HPV 35
11.2 Répétabilité 36
11.3 Reproductibilité 37
11.4 Robustesse 38
11.5 Performances cliniques de PapillOCheck® high-risk 39

12. RÉSUMÉ DU PROTOCOLE DE PAPILLOCHECK® HIGH-RISK 40

12.1 Salle 2 : PCR - Préparation du mélange réactionnel 40
12.2 Salle 2 : PCR - Ajout de la matrice d'ADN / PCR 41
12.3 Salle 3 : Hybridation - Préparation / Réaction d'hybridation 42
12.4 Salle 3 : Lavage et séchage / Lecture et évaluation 43

1. COMPOSITION DU KIT

Kit de test Papill**oCheck**® high-risk [1]	**Contenu**	**Quantité**
PCR MasterMix	5 Papill**oCheck**® high-risk PCR MasterMix[2]	5 x 300 µl
Boîte de lames, 5 x 12 puces	1 boîte de lames Papill**oCheck**® high-risk comportant 5 puces Papill**oCheck**® high-risk [3]	5 x 12 puces
Tampon d'hybridation	2 Papill**oCheck**® high-risk Tampon d'hybridation[4]	2 x 1 000 µl
Tampon A concentré	2 tampons A concentrés Papill**oCheck**® high-risk	2 x 40 ml
Tampon B concentré	1 tampon B concentré Papill**oCheck**® high-risk	1 x 15 ml

[1] Un kit de test Papill**oCheck**® high-risk suffit à analyser 60 échantillons.
[2] Contient tous les composants nécessaires pour la PCR, sauf la Taq ADN polymérase et l'uracil-N-glycosylase. Sur l'étiquette de chaque flacon, Papill**oCheck**® high-risk est abrégé par Papill**oCheck**® hr.
[3] Une puce Papill**oCheck**® high-risk contient 12 micro-puces Papill**oCheck**® high-risk. Sur l'étiquette à code-barres de chaque puce Papill**oCheck**® high-risk, Papill**oCheck**® high-risk est abrégé par Papill**oCheck**® hr.
[4] Sur l'étiquette de chaque flacon, Papill**oCheck**® high-risk est abrégé par Papill**oCheck**® hr.

2. CONSOMMABLES, ÉQUIPEMENT ET MATÉRIEL REQUIS

Il est recommandé d'utiliser Papill**oCheck**® high-risk conjointement aux consommables, équipement et matériel répertoriés et de n'autoriser qu'un personnel qualifié à l'utiliser.

Consommables	Réf. Greiner Bio-One	Quantité
Kit de test Papill**oCheck**® high-risk	505 060	Kit de test pour 60 réactions
Kit de prélèvement Papill**oCheck**®	465 070	10 échantillons
Kit d'extraction d'ADN / Préparation en colonne unitaire oCheck®	515 040	Kit de test pour 50 préparations
Kit d'extraction d'ADN / Préparation en barrettes de 8 colonnes oCheck®	515 050	12 x 8 préparations
Pointes à filtre stériles exempts d'ADNase pour micropipettes[1]		
Pointes à filtre de 0,5 à 10 µl	765 288	96/960
Pointes à filtre de 0,5 à 20 µl	774 288	96/960
Pointes à filtre de 10 à 100 µl	772 288	96/960
Pointes à filtre de 10 à 200 µl	739 288	96/960
Pointes à filtre de 100 à 1 000 µl	750 288	60/600
Microtubes exempts de DNase		
Microtube de 1,5 ml	616 201	500/4000
Microtube de 0,2 ml[2]	683 201	500/1000
8 barrettes pour PCR de 0,2 ml	673 210	125/1250
Barrettes de bouchons pour 8 barrettes pour PCR de 0,2 ml	373 270	125/1250
Tube de polypropylène de 50 ml[3]	210 261	25/450
Pipettes en plastique pour pipeteur		
Pipette de 10 ml	607 180 ou 607 160	1/200
Pipette de 25 ml	760 180 ou 760 160	1/200
Pipette de 50 ml	786 180 ou 768 160	1/200

[1] Certaines tailles de pointe citées sont en option selon les micropipettes disponibles.
[2] En principe, il est recommandé d'utiliser des barrettes pour PCR de 8 tubes. Les microtubes simples (0,2 ml) sont en option si les barrettes ne sont pas disponibles.
[3] Uniquement nécessaire en cas d'absence de centrifugeuse pour lames.

Équipement	Réf. Greiner Bio-One	Quantité
CheckScanner™	862 070	1
Version de base du logiciel CheckReport™ Software	862 080 / 862 090[4]	1
Module Papill**oCheck**® high-risk du logiciel CheckReport™ Software	862 088 / 862 098[4]	1
Chambre d'hybridation oCheck® Hybridisation Chamber avec porte-lame	447 070	1
Poignée pour porte-lame	447 001	1
Rigole de lavage oCheck® Washbox[5]	447 020	1
oCheck® VacSet[6]	863 080	1
oCheck® VacPump[6]	863 070	1

Enzymes requises

- Taq Polymérase : HotStarTaq® ADN polymérase 5 U/µl (Qiagen ; 203203, 203205, 203207, 203209)
- Uracil-N-glycosylase : Uracil-ADN glycosylase 1 U/µl (Fermentas ; réf. EN0361, réf. EN0362)

Consommables supplémentaires requis

- Eau de qualité PCR
- Eau distillée ou désionisée
- Gants à usage unique

Équipement supplémentaire requis

- Micro-centrifugeuse pour microtubes de 1,5 et 2 ml
- Centrifugeuse pour tubes en polypropylène de 50 ml (par ex. BeckmanCoulter ; Allegra X-22 Centrifuge ; C0650 Fixed-Angle Rotor) ou centrifugeuse pour lames (par ex. Labnet : Slide Spinner ; VWR International : Galaxy MiniArray Centrifuge)
- Micro-centrifugeuse pour microtubes simples de 0,2 ml ou barrettes pour PCR de 8 tubes (par ex. Labnet : Spectrafuge Mini Centrifuge)
- Thermocycleur pour PCR :
  GeneAmp® PCR system 9700 (Applied Biosystems)
  ou Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems)
- Bain-marie (50 °C)
- Micropipettes (différentes plages entre 1 et 1 000 µl)
- Multi-pipette 8 canaux (5 - 50 µl), par ex. Brand Transferpette®-8 (Brand)
- Pipeteur pour pipettes en verre et en plastique
- Vortex
- Racks pour différents microtubes

Autre matériel requis

- Ordinateur (concernant le système requis, voir les manuels d'utilisation du scanner CheckSanner™ et du logiciel CheckReport™ Software)

[4] CheckReport™ Software est disponible en deux versions. La référence 862 090 / 862 098 remplit en outre les critères de la règlementation 21CFR Part 11.
[5] Pour la procédure de lavage de Papill**oCheck**® high-risk, trois chambres de lavage oCheck® Washboxes sont nécessaires.
[6] Uniquement nécessaire en association avec la réf. 515 050.

3. EXPÉDITION ET STOCKAGE

Le kit de test Papill**oCheck**® high-risk est expédié à température ambiante. Il doit toutefois être stocké **à 4-8 °C** immédiatement à réception, et protégé de la lumière. Lorsqu'ils sont conservés correctement, le kit de test Papill**oCheck**® high-risk et ses composants peuvent être utilisés jusqu'à la date de péremption indiquée. Dans ces conditions, la durée de conservation correspond à la date de péremption après la première ouverture du kit et de ses composants.

4. CONSIGNES DE SÉCURITÉ

Le kit de test Papill**oCheck**® high-risk est réservé à un usage en laboratoire et pas pour médication, usage doméstique ou d'autres fins. Toujours porter une blouse adaptée, des gants à usage unique et des lunettes de protection et respecter les consignes de sécurité données dans ce chapitre.

Les composants suivants du kit de test Papill**oCheck**® high-risk contiennent des substances nocives ou dangereuses.

Composant	Substance dangereuse	Symbole de danger	Phrases de risque	Phrases de risque	Phrases de risque
Tampon d'hybridation	Thiocyanate de guanidine (25-60 %)		Nocif*	R 20/21/22 R 32 R 52/53	S13 S61 S36/37
Tampon B	< 20 % de dodécylsulfate de sodium		Dangereux*	R 21/22 R 36/37/38	S26 S36/37

* Informations relatives aux risques non nécessaires pour les petits conditionnements atteignant 125 g ou ml (conformément aux directives 67/548/CEE, article 25 et 1999/45/CE, article 12, et à la législation allemande relative aux substances dangereuses GefStoffV § 20 (3) et TRGS 200 7.1). Pour de plus amples informations, consulter la Fiche de données de sécurité.

Phrases de risque

R 21/22	Nocif en cas de contact avec la peau et d'ingestion
R 20/21/22	Nocif en cas d'inhalation, de contact avec la peau et d'ingestion
R 32	Au contact d'un acide, dégage un gaz très toxique
R 36/37/38	Irritant pour les yeux, le système respiratoire et la peau
R 52/53	Nocif pour les organismes aquatiques, peut entraîner des effets néfastes à long terme pour l'environnement aquatique

Phrases de sécurité

S13	Conserver à l'écart des aliments et boissons, y compris ceux pour animaux
S26	En cas de contact avec les yeux, rincer immédiatement et abondamment à l'eau et consulter un médecin
S36/37	Porter des vêtements et des gants de protection appropriés
S61	Éviter le rejet dans l'environnement. Consulter les instructions spéciales/la fiche de données de sécurité.

La version actuelle de la Fiche de données de sécurité de ce produit peut être téléchargée depuis le site Web de Greiner Bio-One : **www.gbo.com/bioscience/biochips_download**

5. ÉLIMINATION DES DÉCHETS

Après avoir lavé et séché la puce Papill**oCheck**® high-risk, il est possible d'éliminer les solutions de lavage I, II et III sans précaution particulière. Éliminer la puce Papill**oCheck**® high-risk usagée, les composants du kit inutilisés et le mélange d'hybridation inutilisé avec les déchets chimiques du laboratoire. Respecter toutes les réglementations nationales et locales relatives à l'élimination.

6. INTRODUCTION

L'infection persistante à papillomavirus humain (HPV) carcinogène est présente dans la quasi-totalité des cas de cancer du col de l'utérus et représente la deuxième cause de cancer la plus fréquente chez les femmes du monde entier.[1] À ce jour, plus de 100 types HPV ont été identifiés, dont environ 40 sont transmis sexuellement et infectent la muqueuse génitale. Les types HPV du col de l'utérus sont classés en deux groupes : haut risque (HPV haut risque) et bas risque (HPV bas risque). Alors que les types HPV haut risque sont associés à un risque accru de développer un cancer du col de l'utérus, les types HPV bas risque provoquent principalement des verrues génitales bénignes.[2] Cependant, même dans le groupe à haut risque, le risque relatif de développer un cancer ou de souffrir de lésions intra-épithéliales du col de l'utérus (CIN) dépend du type de HPV.[3] Environ 70 % de tous les cas de cancer du col de l'utérus sont liés à une infection persistante à HPV 16 ou 18. Les types bas risque les plus fréquents sont HPV 6 et 11. Selon le lien étiologique quasi-absolu entre le HPV carcinogène et le cancer du col de l'utérus, les tests du HPV haut risque sont désormais envisagés dans le cadre du dépistage primaire du cancer du col de l'utérus.[4]

6.1 Destination

Papill**oCheck**® high-risk est un kit de diagnostic destiné à être utilisé pour la détection qualitative et le génotypage de 14 types de papillomavirus génital humain à haut risque (HPVhr) dans des préparations d'ADN issues de frottis du col de l'utérus humains. Le kit est destiné à être utilisé exclusivement par du personnel qualifié.

Papill**oCheck**® high-risk respecte les exigences de la directive relative au diagnostic in vitro (98/79/CE), et dispose dès lors du marquage de conformité CE. Tout résultat diagnostique obtenu à l'aide de Papill**oCheck**® high-risk doit être interprété conjointement avec d'autres résultats cliniques ou de laboratoire.

6.2 Types HPV détectables avec Papill**oCheck**® high-risk

Papill**oCheck**® high-risk permet d'identifier 14 types de papillomavirus humain carcinogène à haut risque (HPVhr) (**Tableau 1**).

Tableau 1 : Types HPV détectables avec Papill**oCheck**® **high-risk**

HPV 16	**HPV 51**
HPV 18	**HPV 52**
HPV 31	**HPV 56**
HPV 33	**HPV 58**
HPV 35	**HPV 59**
HPV 39	**HPV 66**
HPV 45	**HPV 68**

[1] Walboomers, J. et al (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. J Pathol. 189(1):12-9.
[2] Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. Clin Microbiol Rev. 2003;16:1–17.
[3] Bosch F.X. et al. (2008). Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. Vaccine. 26 Suppl 10:K1-16.
[4] Meijer, C.J. et al. (2009). Guidelines for human papillomavirus DNA test requirements for primary cervical cancer screening in women 30 years and older. Int J Cancer. 124(3):516-20.

6.3 Principe du test

Papill**oCheck**® high-risk est un kit de test à micro-puces destiné à la détection et au génotypage d'un fragment du gène E1 du génome du papillomavirus humain (HPV). La procédure du test est résumée dans la **Figure 1**.

Avant de procéder à l'analyse Papill**oCheck**® high-risk, il faut extraire l'ADN d'un frottis du col de l'utérus. Le prélèvement d'échantillon et l'extraction d'ADN ne font pas partie du kit de test Papill**oCheck**® high-risk. Des produits dédiés au prélèvement d'échantillon (kit de prélèvement Papill**oCheck**® Collection Kit) et à l'extraction d'ADN (oCheck® DNA Extraction Kit) sont également disponibles auprès de Greiner Bio-One et doivent être achetés séparément (voir les informations utiles pour la commande au chapitre 2).

Après extraction de l'ADN génomique viral et humain d'un frottis du col de l'utérus, un fragment de 350 bp du gène E1 viral est amplifié par réaction en chaîne par polymérase (PCR) en présence d'un ensemble d'amorces spécifiques au HPV. Dans le cadre de la même réaction, un fragment du gène humain non répétitif ADAT1 (adénosine déaminase1 spécifique à l'ARNt humain) est amplifié pour surveiller la présence de matériel d'échantillon humain dans le frottis du col de l'utérus (contrôle d'échantillon), et un modèle de contrôle interne présent dans le Papill**oCheck**® high-risk PCR MasterMix est amplifié pour surveiller la performance de la PCR (contrôle de PCR). Le Papill**oCheck**® high-risk PCR MasterMix contient en outre du dUTP. Toute contamination par recirculation potentielle issue des réactions PCR précédentes peut donc être exclue en utilisant un traitement à base d'uracil-n-glycosylase (UNG) (voir le chapitre 8.2.2).

Les produits de PCR sont ensuite hybridés avec des sondes d'ADN spécifiques, et avec des contrôles fixés à la surface de la puce Papill**oCheck**® high-risk. Chaque puce contient 12 micro-puces ADN, ce qui permet d'analyser simultanément 12 frottis du col de l'utérus. Au cours de l'hybridation, l'ADN lié est marqué par fluorescence, et l'ADN non lié est éliminé aux étapes de lavage suivantes. L'efficacité de l'hybridation est surveillée (contrôle d'hybridation).

Enfin, la puce Papill**oCheck**® high-risk est lue, analysée et évaluée automatiquement, respectivement grâce au scanner CheckScanner™ et au logiciel CheckReport™ Software (voir les informations utiles pour la commande au chapitre 2). Le CheckScanner™ est un scanner laser à deux couleurs (longueurs d'onde d'excitation de 532 nm et 635 nm) qui permet de détecter le signal fluorescent généré par la présence de produits d'amplification spécifiques au HPV et des contrôles (voir le chapitre 6.4.2). Le logiciel CheckReport™ Software permet la visualisation, l'analyse et l'évaluation des résultats, et affiche automatiquement les valeurs des types HPV détectés et des contrôles dans un rapport détaillé.

Le rapport indique clairement la présence ou l'absence d'un ou plusieurs des 14 types HPV à haut risque détectables, et les contrôles sur puce complets permettent d'obtenir une analyse extrêmement fiable.

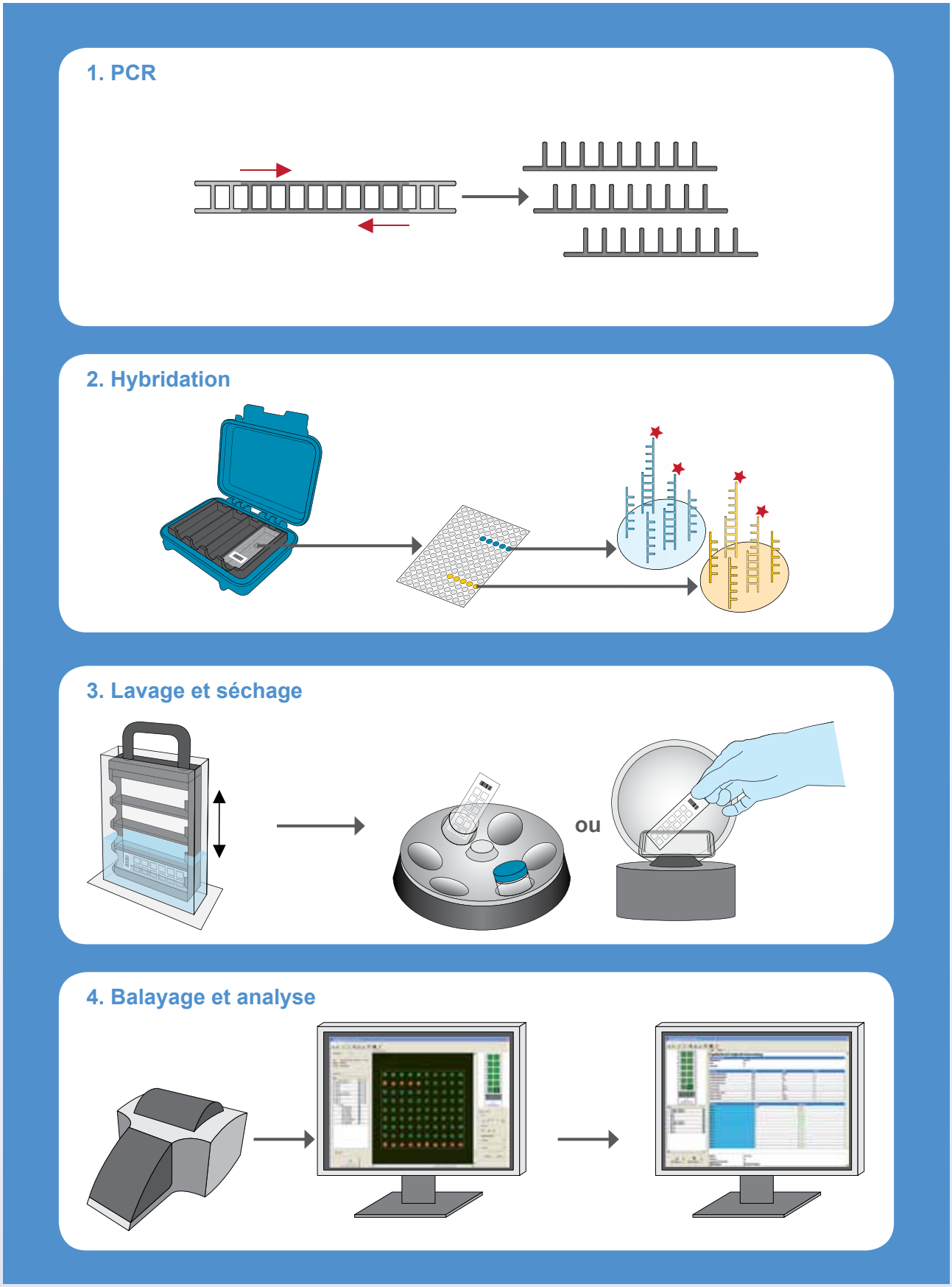


Figure 1 : Procédure du test PapillOCheck® high-risk

1. **PCR :** Après l'extraction d'ADN, un fragment de 350 bp du gène E1 viral et des fragments de deux cibles de contrôle sont amplifiés par PCR. Les produits d'amplification sont ensuite hybridés avec des sondes d'ADN complémentaires sur la puce.
2. **Hybridation :** Chaque type HPV est détecté par une sonde d'ADN spécifique présente en cinq exemplaires. Le marquage fluorescent est introduit au cours de l'hybridation.
3. **Lavage et séchage :** L'ADN non lié est éliminé aux étapes de lavage suivantes.
4. **Balayage et analyse :** La puce PapillOCheck® high-risk est balayée, analysée et évaluée à l'aide du scanner CheckScanner™ et du logiciel CheckReport™ Software. Un rapport indiquant clairement la présence ou l'absence d'un ou plusieurs des 14 types HPV détectables est généré.

6.4 Conception de la puce ADN Papill**oCheck**® high-risk

6.4.1 Design de la puce Papill**oCheck**® high-risk

Chaque puce Papill**oCheck**® high-risk contient 12 micro-puces nommées de A1 à B6. Chaque micro-puce Papill**oCheck**® high-risk comporte 28 sondes différentes et présente un bord surélevé. Chaque sonde est deposée en cinq exemplaires. Le design de la micro-puce ADN Papill**oCheck**® high-risk est illustré dans la **Figure 2**, et les-contrôles sur puce sont expliqués plus en détail au chapitre 6.4.2.

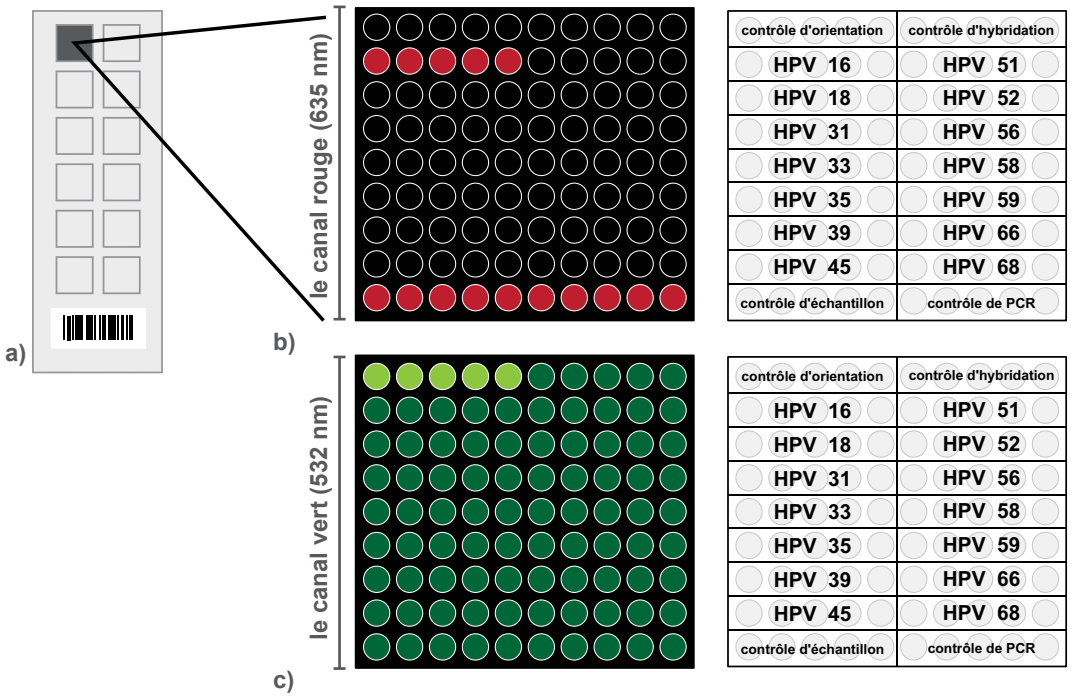


Figure 2 : Conception de la puce Papill**oCheck**® **high-risk**
a) Schéma de la puce Papill**oCheck**® high-risk. **b)** et **c)** Images affichées par le logiciel CheckReport™ Software pour les deux longueurs d'onde d'excitation utilisées pour la lecture (b) le canal rouge : 635 nm ; c) le canal vert : 532 nm) et schémas du design de la micro-puce Papill**oCheck**® high-risk. Les sondes spécifiques au type HPV et les contrôles sur puce sont présentés.

6.4.2 Contrôles sur puce

La conception de la puce ADN Papill**oCheck**® high-risk intègre des contrôles sur puce complets. Plusieurs systèmes de contrôle surveillent les étapes clés du test et du traitement de la puce, y compris la qualité de l'échantillon et l'extraction d'ADN (contrôle d'échantillon), la qualité de la PCR (contrôle de PCR), l'efficacité de l'hybridation (contrôle d'hybridation), ainsi que l'homogénéité et la qualité de l'impression (contrôle d'orientation et contrôle d'impression). Outre la présence ou l'absence de types HPV, le logiciel CheckReport™ Software affiche automatiquement les valeurs des contrôles et les types HPV détectés, dans un rapport détaillé. Les deux longueurs d'onde d'excitation du scanner CheckScanner™ sont utilisées pour afficher les différents contrôles. Le canal rouge (longueur d'onde d'excitation de 635 nm) sert au contrôle de la performance du test (contrôle d'échantillon et de PCR), alors que la qualité de l'hybridation et de la puce (contrôle d'hybridation, d'orientation et d'impression) est évaluée dans le canal vert (longueur d'onde d'excitation de 532 nm).

Contrôle d'échantillon
Papill**oCheck**® high-risk contrôle la qualité de l'échantillon et/ou de l'extraction d'ADN en amplifiant un fragment du gène humain non répétitif ADAT1 (adénosine déaminase1 spécifique à l'ARNt humain). Si de l'ADN humain est présent en quantité suffisante dans l'ADN extrait du frottis du col de l'utérus, un signal fluorescent est généré sur les spots de contrôle de l'échantillon.

Si l'amplification de l'ADAT1 est nulle ou insuffisante, le logiciel CheckReport™ Software indique que le contrôle d'échantillon a échoué (« failed ») et l'analyse doit être recommencée en raison de la quantité insuffisante de cellules dans le frottis de col de l'utérus et/ou du manque de performance de l'extraction (voir le chapitre 9).

Contrôle de PCR
Papill**oCheck**® high-risk contrôle également la qualité de la PCR. L'amplification d'un ADN de contrôle interne présent dans le Papill**oCheck**® high-risk PCR MasterMix génère un signal sur les spots de contrôle de PCR de la puce Papill**oCheck**® high-risk. La qualité de la réaction d'amplification est également évaluée automatiquement par le logiciel CheckReport™ Software. Si la performance de la PCR est inférieure à un seuil prédéfini, le logiciel CheckReport™ Software indique que le contrôle PCR a échoué (« failed ») et l'analyse doit être recommencée (voir Chapitre 9).

Si la quantité d'ADN de HPV contenue dans l'échantillon est très élevée, le signal fluorescent des spots de contrôle de PCR peut être faible, voire nul, en raison de la compétition qui s'est exercée pendant la PCR. Dans ce cas, le signal fluorescent d'au moins une sonde spécifique au HPV doit dépasser un seuil prédéfini pour que le test soit considéré comme valide.

Contrôle d'hybridation
Papill**oCheck**® high-risk contrôle l'efficacité de l'hybridation en utilisant une sonde marquée de fluorescence, contenue dans le tampon d'hybridation Papill**oCheck**® high-risk Hybridisation Buffer, qui s'hybride en séquences d'ADN spécifiques sur la puce Papill**oCheck**® high-risk. Une hybridation suffisante génère des signaux de fluorescence sur chaque spot de la puce. Les résultats de cinq spots de contrôle d'hybridation présents sur la puce Papill**oCheck**® high-risk sont également évalués par le logiciel CheckReport™ Software.

Contrôle d'orientation et d'impression
Les spots de contrôle d'orientation de la puce Papill**oCheck**® high-risk génèrent des signaux de fluorescence, quelle que soit l'efficacité du processus d'hybridation. Le logiciel CheckReport™ Software utilise ces spots comme des éléments d'orientation pour pouvoir trouver les spots de façon satisfaisante ; il s'agit là d'une condition préalable à l'analyse correcte des signaux. En outre, la qualité du processus d'impression est contrôlé par la présence d'un signal fluorescent vert sur chaque spot de la puce (contrôle d'impression).

7. CONDITIONS GÉNÉRALES DE TRAVAIL AVEC PAPILLOCHECK® HIGH-RISK

7.1 Instructions générales

Lors de la mise en œuvre des techniques de pointe actuellement utilisées en biologie moléculaire dans un laboratoire, les instructions suivantes doivent être prises en compte afin de garantir une sécurité maximale pour les laborantins, mais aussi des résultats d'excellente qualité.

Les techniques de biologie moléculaire, notamment l'extraction d'ADN, l'amplification et la détection des produits d'amplification, doivent être mises en œuvre par un personnel correctement formé. En outre, des conditions de travail nettes et bien structurées sont indispensables pour éviter des résultats erronés, tels que ceux dus à une dégradation ou à une contamination de l'ADN par les produits d'amplification. À cette fin, il est nécessaire de séparer les zones d'extraction, d'amplification et de détection, comme indiqué au chapitre 7.2.

Chaque zone doit être munie d'un équipement, de consommables, de blouses et de gants séparés. Ne jamais transférer les blouses, les gants ou les équipements d'une zone distincte à l'autre.

7.2 Séparation des salles

Figure 3 illustre la façon dont un laboratoire peut être séparé en trois sections distinctes. L'une des salles est exclusivement utilisée pour l'extraction d'ADN, la deuxième pour la mise en place et la réalisation des réactions de PCR et la troisième pour l'hybridation et l'analyse. Afin d'éviter la contamination des échantillons, chaque salle doit être exclusivement réservée à l'application ou à la technique indiquée. L'utilisation de couleurs peut être avantageuse pour éviter un échange accidentel d'équipement ou de consommables entre les zones.

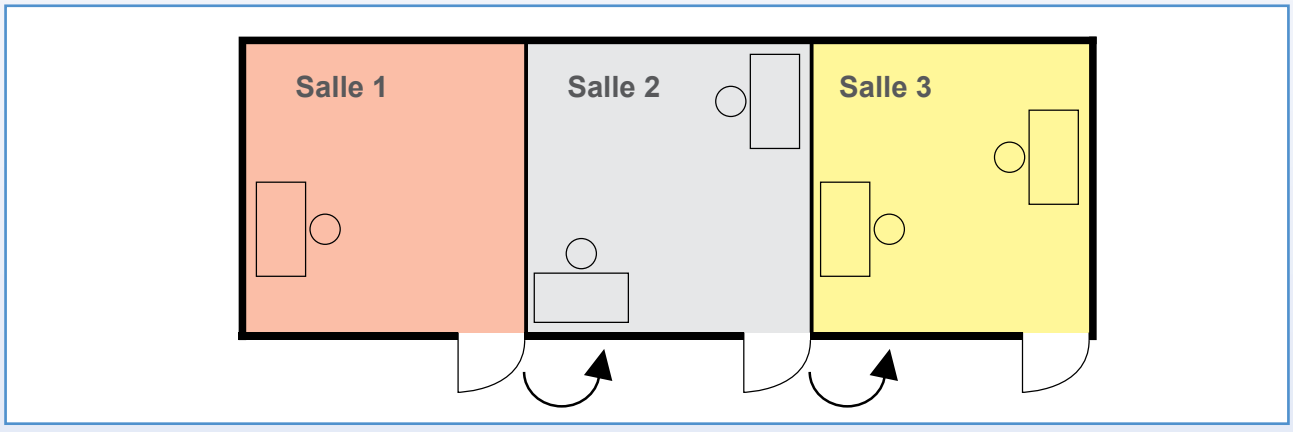


Figure 3 : Séparation des salles
Salle 1 : L'ensemble de la procédure d'extraction d'ADN doit être effectuée dans cette salle.
Salle 2 : Dans cette salle, le mélange réactionnel destiné à la PCR est préparé et aliquoté (idéalement, sous une hotte à PCR). L'ajout des échantillons d'ADN extraits dans la salle 1 doit être effectué dans un espace à part de la salle 2.
Salle 3 : Les étapes de réaction d'hybridation, de lavage et de séchage de la puce ont lieu dans la troisième salle de laboratoire. De plus, le scanner CheckScanner™ est utilisé conjointement avec le logiciel CheckReport™ Software pour l'analyse finale du test Papill**oCheck**® high-risk.

! Ni l'équipement ni les consommables ne doivent être interchangés entre les différentes salles et les différents espaces du laboratoire. Ainsi, une duplication de l'équipement et des consommables est nécessaire et doit être prise en compte lors de l'équipement du laboratoire.

7.3 Avertissements et précautions

7.3.1 Prévention de la contamination

- Il faut porter une blouse tout au long de la procédure, et chaque salle du laboratoire doit disposer de plusieurs jeux de blouses.
- Il faut porter des gants à chaque étape de l'analyse et il faut en changer régulièrement, notamment pendant l'extraction d'ADN.
- L'espace de travail doit être décontaminé à l'aide d'une solution de nettoyage appropriée.
- Ne jamais toucher l'intérieur du bouchon d'un microtube. Pour éviter une contamination croisée, n'ouvrir qu'un seul tube à la fois.
- Utiliser des pointes à filtre pour micropipettes appropriées, équipées d'une barrière aérosole (sans DNase, sans RNase et sans ADN humain). Toujours changer les pointes des pipettes entre les transferts de liquides.

7.3.2 Instructions pour la manipulation des puces ADN

- Les puces ADN doivent être utilisées dans un environnement sans poussière. Le dépôt de poussière et d'autres particules sur la surface de la puce doit être évité.
- Ne pas toucher la zone d'hybridation située à la surface de la puce.
- Seul le côté étiqueté de la puce est destiné à l'hybridation.
- Ne pas utiliser de marqueurs pour identifier les puces ADN car ils génèrent une fluorescence non spécifique sur la puce.
- Les puces ADN sont exclusivement à usage unique. Les puces hybridées ne peuvent pas être réutilisées.
- Conserver les puces inutilisées dans leur boîte d'origine, à l'intérieur de la poche zippée fournie qui contient un dessicatif.

7.3.3 Précautions générales

- Le présent kit est exclusivement destiné à être utilisé à des fins de diagnostic in vitro et ne doit être utilisé que par le personnel formé aux pratiques de laboratoire de diagnostic in vitro.
- À réception, vérifier que les composants du kit ne sont pas endommagés. Si l'un des composants (par exemple, les flacons de tampon) est endommagé, contacter le distributeur Greiner Bio-One local. Ne pas utiliser des composants de kit endommagés, faute de quoi les performances du kit pourraient être réduites.
- Ne pas utiliser le kit de test Papill**oCheck**® high-risk après la date de péremption.
- Ne pas utiliser de réactifs périmés.
- Ne pas mélanger les réactifs de différents lots.
- Utiliser exclusivement les réactifs/l'équipement fournis avec le kit et ceux recommandés par le fabricant.
- Il est nécessaire de régulièrement calibrer/entretenir les micropipettes, le bain-marie et le bloc chauffant.
- Le pipetage de petites quantités de l'ordre du microlitre est une opération délicate. Il faut dès lors veiller à pipeter avec la plus grande précision possible.
- Pour éviter toute contamination microbienne des réactifs, retirer les aliquotes des tubes de réactif avec prudence.
- Toutes les étapes de centrifugation doivent être réalisées à température ambiante (18-25 °C).

7.3.4 Travailler en toute sécurité

- Faire preuve de prudence lors de la manipulation d'échantillons biologiques contenant du matériel humain potentiellement infectieux. Afin de réduire le risque d'infection lié à du matériel potentiellement infectieux, il est recommandé de travailler sous flux laminaire jusqu'à ce que la lyse des échantillons soit terminée. Manipuler et éliminer tous les échantillons biologiques comme s'ils étaient susceptibles de transmettre des agents infectieux.
- Ne jamais pipeter les solutions à la bouche.
- Ne pas manger, boire, fumer ni appliquer de produits cosmétiques dans les zones de travail.
- Éviter tout contact direct avec les échantillons biologiques, ainsi que toute projection des échantillons.
- Toujours porter une blouse, des gants et des lunettes de protection dans le cadre d'un travail avec des échantillons humains.
- Se laver soigneusement les mains après avoir manipulé les échantillons et les réactifs.

8. PROCÉDURE PAPILLOCHECK® HIGH-RISK

Le chapitre suivant décrit en détail les différentes étapes de travail menant in fine à l'élaboration d'un rapport détaillé, indiquant clairement la présence ou l'absence d'un ou plusieurs des 14 types HPV à haut risque détectables dans chaque frottis du col de l'utérus analysé. La **Figure 4** présente une vue d'ensemble des différentes étapes de travail à réaliser. Elle illustre également le sous-chapitre correspondant, qui décrit l'étape du test en particulier. Les étapes de travail doivent être menées dans l'ordre indiqué dans ce chapitre. Chaque étape pratique est indiquée par une flèche bleue .

!

Le prélèvement des échantillons, l'extraction d'ADN et l'analyse avec le logiciel CheckReport™ Software ne font pas partie du kit de test Papill**oCheck**® high-risk. La description de ces étapes de travail est donc abrégée dans ce chapitre. Pour de plus amples informations, consulter les manuels d'utilisation correspondants, par exemple dans le kit de prélèvement Papill**oCheck**® Collection Kit, le kit d'extraction d'ADN oCheck® DNA Extraction Kit et le logiciel CheckReport™ Software.

8.1 Prélèvement d'échantillon et extraction d'ADN

8.1.1 Prélèvement d'échantillon

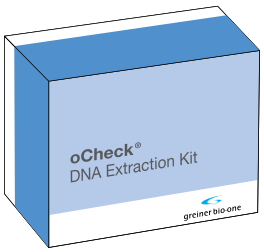
Le prélèvement d'échantillon ne fait pas partie du kit de test Papill**oCheck**® high-risk. Un kit de prélèvement dédié aux frottis du col de l'utérus (Papill**oCheck**® Collection Kit) est également disponible auprès de Greiner Bio-One (voir les informations utiles pour la commande au chapitre 2).

Papill**oCheck**® high-risk a été validé à l'aide d'ADN préparé avec le kit d'extraction d'ADN oCheck® DNA Extraction Kit, à partir de frottis du col de l'utérus humains prélevés grâce à l'un des systèmes ou supports de prélèvement suivants :

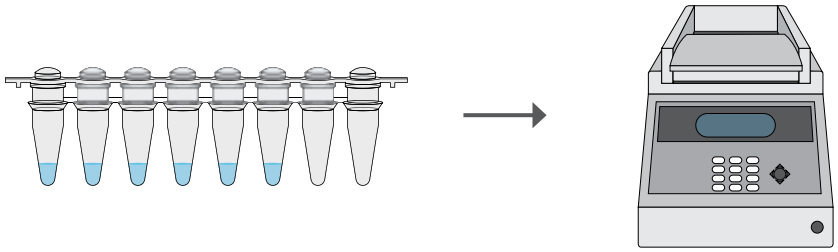
- Kit de prélèvement Papill**oCheck**® Collection Kit (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Allemagne)
- PreservCyt® (Hologic, Bedford, MA, États-Unis)
- Surepath™ (BD, Franklin Lakes, NJ, États-Unis)
- STM™ (Qiagen, Hilden, Allemagne).

Pour de plus amples informations sur les supports de transport ou les systèmes d'extraction d'ADN adaptés, contacter un distributeur Greiner Bio-One local ou consulter le site Web de Greiner Bio-One à l'adresse suivante : **www.gbo.com/bioscience/biochips_download**

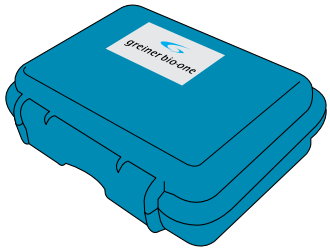
Chapitre 8.1.2 Extraction d'ADN



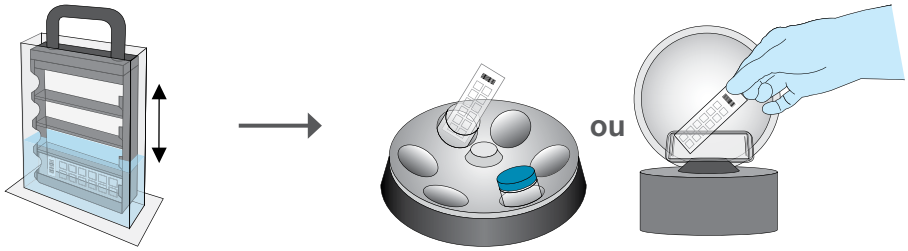
Chapitre 8.2 PCR



Chapitre 8.3.2 Hybridation



Chapitre 8.3.3 Lavage et séchage



Chapitre 8.4. Lecture et évaluation

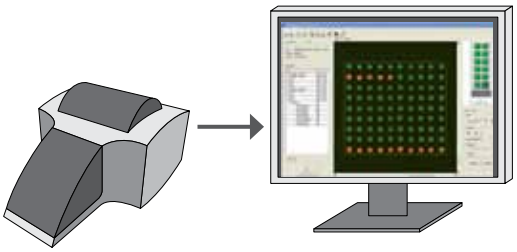


Figure 4 : Vue d'ensemble des différentes étapes de travail Papill**oCheck® high-risk**

8.1.2 Extraction d'ADN

L'extraction d'ADN ne fait pas partie du kit de test Papill**oCheck**® high-risk. Cette procédure doit être effectuée avant l'analyse Papill**oCheck**® high-risk, à l'aide du kit d'extraction d'ADN oCheck® DNA Extraction Kit, également fourni par Greiner Bio-One (voir les informations utiles pour la commande au chapitre 2). Suivre rigoureusement le manuel d'utilisation du kit d'extraction d'ADN oCheck® DNA Extraction Kit.

205 µl de solution d'échantillon doivent être utilisés pour extraire l'ADN à l'aide du kit d'extraction d'ADN oCheck® DNA Extraction Kit.

Les frottis du col de l'utérus qui sont prélevés avec
- le kit de prélèvement Papill**oCheck**® Collection Kit (Greiner Bio-One ; réf. 465 070)
- dans le support de prélèvement PreservCyt® (Hologic, Bedford, MA, États-Unis)

peuvent être traités directement.

Les frottis du col de l'utérus qui sont prélevés avec
- le support de prélèvement Surepath™ (BD, Franklin Lakes, NJ, États-Unis) doivent être lavés avant l'emploi : centrifuger **250 µl** d'échantillon pendant **5 minutes à 11 000 g** et remettre le culot en suspension dans **250 µl** d'eau distillée. Les **250 µl** peuvent ensuite être traités avec le kit d'extraction d'ADN oCheck® DNA Extraction Kit.

Les frottis du col de l'utérus qui sont prélevés avec
- le support de prélèvement STM™ (Qiagen, Hilden, Allemagne) doivent être dilués : utiliser **100 µl** d'échantillon et ajouter **150 µl** d'eau distillée. Les **250 µl** d'échantillon dilué peuvent être traités avec le kit d'extraction d'ADN oCheck® DNA Extraction Kit.

En général, si le frottis du col de l'utérus semble très concentré et déjà agrégé, il doit être dilué et homogénéisé avant le début de l'extraction d'ADN !

Les frottis du col de l'utérus qui sont très dilués et qui ne présentent pas de cellule visible doivent être concentrés pour obtenir une plus forte concentration de cellules en vue de l'extraction d'ADN : centrifuger jusqu'à 1 000 µl d'échantillon pendant 5 minutes à 11 000 g et remettre le culot en suspension dans 250 µl d'eau distillée. Les 250 µl peuvent ensuite être traités avec le kit d'extraction d'ADN oCheck® DNA Extraction Kit.

!

Cette étape de concentration est uniquement adaptée aux frottis du col de l'utérus prélevés à l'aide du kit de prélèvement Papill**oCheck**® Collection Kit, sur un support de prélèvement PreservCyt® ou sur un support de prélèvement Surepath™. En cas d'utilisation du support de prélèvement STM™, une concentration par centrifugation n'est pas possible.

8.2 Réaction en chaîne par polymérase (PCR)

La PCR est une méthode très sensible qui permet de détecter des quantités d'ADN extrêmement faibles. Des précautions spéciales doivent être observées pour éviter toute contamination de la réaction (voir le chapitre 7). Les enzymes HotStarTaq® polymérase et uracil-N-glycosylase sont nécessaires, mais elles ne sont pas fournies dans le kit de test Papill**oCheck**® high-risk et doivent être achetées séparément (voir le chapitre 2).

> **!** Le kit de test Papill**oCheck**® high-risk a été validé à l'aide de HotStarTaq® polymérase de Qiagen et d'uracil-N-glycosylase de Fermentas (voir les informations utiles pour la commande au chapitre 2). Il est impératif d'utiliser ces enzymes pour atteindre les performances établies.

8.2.1 Configuration du thermocycleur

Le kit de test Papill**oCheck**® high-risk a été validé avec les thermocycleurs suivants :

- GeneAmp® PCR system 9700 (Applied Biosystems)
- Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems).

> **!** Il est absolument nécessaire d'utiliser l'un des thermocycleurs cités ci-dessus pour atteindre les performances établies.

Le programme du thermocycleur de PCR Papill**oCheck**® high-risk est résumé dans le **Tableau 2**.

Tableau 2 : Programme du thermocycleur de PCR Papill**oCheck**® **high-risk**

Durée	Temp. °C	Nombre de cycles
20 min	37 °C	1
15 min	95 °C	1
30 s 25 s 45 s	95 °C 55 °C 72 °C	40
30 s 45 s	95 °C 72 °C	15
Gel	10 °C	

En outre, les paramètres d'exécution suivants doivent être définis pour chaque thermocycleur. Pour savoir comment les configurer, consulter le manuel d'utilisation du thermocycleur correspondant.

GeneAmp® PCR system 9700 (Applied Biosystems)
Définir le volume de réaction sur 26 µl, la vitesse de rampe sur « 9600 » et la température du couvercle sur 103 °C.

Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems)
Utiliser l'outil Convert Method du thermocycleur Veriti™ 96-Well Thermal Cycler pour accéder au programme de PCR Papill**oCheck**® high-risk, et choisir « 9600 Emulation Mode » (Mode d'émulation 9 600). Définir le volume de réaction sur 26 µl et la température du couvercle sur 103 °C.

8.2.2 Traitement par uracil-N-Glycosylase (UNG)[5]

Le Papill**oCheck**® high-risk PCR MasterMix contient du dUTP, qui est intégré dans les produits d'amplification pendant la PCR Papill**oCheck**® high-risk ; les produits de PCR risquent donc d'être dégradés par l'UNG. L'UNG coupe le produit de PCR au niveau des sites où un résidu de déoxyuridylate a été incorporé. Les produits de PCR coupés ne seront pas amplifiés dans la réaction suivante. Un traitement UNG peut donc aussi être utilisé pour éliminer une contamination par recirculation liée aux réactions PCR précédentes.[6]

- Diluer l'uracil-N-glycosylase dans de l'eau de qualité PCR au **1:200**. Utiliser une nouvelle dilution d'UNG pour chaque préparation de réaction PCR Papill**oCheck**® high-risk (voir le chapitre 8.2.3). Ne pas réutiliser l'UNG dilué.
- Mélanger soigneusement la dilution d'UNG en la passant au vortex pendant 2 secondes puis en la centrifugant, ou en la pipetant plusieurs fois.

La concentration initiale d'uracil-N-glycosylase est de 1 U/µl. La concentration de la dilution est donc de 0,005 U/µl.

> **!** Le kit de test Papill**oCheck**® high-risk a été validé à l'aide d'uracil-N-glycosylase de Fermentas (voir le chapitre 2). Il est impératif d'utiliser cette enzyme pour atteindre les performances établies.

- Ajouter **1 µl** de cette dilution à chaque réaction PCR Papill**oCheck**® high-risk (voir le chapitre 8.2.3, **Tableau 3**).

Cette quantité est suffisante pour éliminer la contamination par recirculation de la PCR. Veiller à ne pas utiliser une solution d'UNG plus concentrée car cela pourrait nuire aux performances de la PCR, avec pour résultat une baisse de la sensibilité de Papill**oCheck**® high-risk.

En général, pour le traitement UNG, le mélange réactionnel de PCR est incubé pendant 20 minutes à 37 °C. Ensuite, l'UNG est inactivé par une étape d'incubation supplémentaire de 15 minutes à 95 °C. Ces deux étapes sont déjà intégrées dans la PCR Papill**oCheck**® high-risk ; elles correspondent aux deux premières étapes du programme du thermocycleur (voir le **Tableau 2**). L'inactivation de l'uracil-N-glycosylase et l'activation de la HotStarTaq® Polymerase se produisent au cours de la seconde étape (15 minutes à 95 °C).

> **!** Le système UNG intégré dans la PCR Papill**oCheck**® high-risk n'élimine que la contamination croisée avec les produits de PCR des PCR précédentes. Il est impossible d'éliminer les autres contaminations, survenant par exemple pendant la préparation de l'échantillon, l'extraction ou l'ajout de l'ADN à la réaction PCR. Il est donc toujours nécessaire de suivre les instructions et les précautions particulières pour éviter la contamination décrite au chapitre 7.

[5] L'achat du Papill**oCheck**® high-risk s'accompagne d'une licence limitée en vertu des brevets américains n° 5,035,996 ; 5,683,896 ; 5,945,313 ; 6,287,823 et 6,518,026, ainsi que des brevets étrangers correspondants.

[6] Longo, M.C., et al., Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions, Gene, 93, 125-128, 1990.

8.2.3 Préparation de la PCR

À l'exception de la HotStarTaq® polymérase et de l'uracil-N-glycosylase, le Papill**oCheck**® high-risk PCR MasterMix contient déjà tous les composants nécessaires à la PCR (tampon de PCR, $MgCl_2$, dNTP, amorces et ADN contrôle de PCR).

> **!** Le kit de test Papill**oCheck**® high-risk a été validé à l'aide de HotStarTaq® polymérase de Qiagen (voir le chapitre 2). Il est impératif d'utiliser cette enzyme pour atteindre les performances établies.

De manière optimale, la préparation du mélange réactionnel est réalisé dans un environnement protégé, par exemple sous une hotte à PCR, pour éviter toute contamination de la réaction.

- Préparer le mélange réactionnel (composé de Papill**oCheck**® high-risk PCR MasterMix, HotStarTaq® polymérase et uracil-N-glycosylase) pour la quantité requise de PCR, comme indiqué dans le **Tableau 3**.

Pour analyser plusieurs échantillons, le mélange réactionnel doit être préparé en lot (dans la quantité requise pour toutes les analyses). Pour s'adapter aux variations de volume qui surviennent au cours du pipetage, il est recommandé d'augmenter le nombre de réactions (n) de 1 pour chaque puce (= n + 1). Par exemple, préparer un volume de mélange réactionnel pour 13 amplifications si 12 échantillons doivent être testés (voir le **Tableau 3**). Toujours utiliser un flacon de MasterMix pour les réactions d'une puce.

> **!** Il est recommandé d'inclure un contrôle négatif pour chaque lot de Papill**oCheck**® high-risk PCR MasterMix préparé. Le tampon d'élution d'ADN provenant du kit d'extraction d'ADN approprié ou de l'eau de qualité PCR peut servir de contrôle négatif.

- Mélanger soigneusement le mélange réactionnel en le passant au vortex pendant 2 secondes puis en le centrifugant, ou en le pipetant plusieurs fois.
- Aliquoter le mélange réactionnel en en pipetant **21 µl** pour chaque PCR, dans un microtube pour PCR de 0,2 ml à paroi fine.

Ajouter de l'ADN dans un espace de travail séparé de celui de la préparation du mélange réactionnel (voir le chapitre 7.2).

- Ajouter **5 µl** d'extrait d'ADN pour chaque PCR et mélanger en passant au vortex pendant 2 secondes puis en centrifugant, ou en pipetant plusieurs fois. Le volume total d'une PCR est de **26 µl**.
- Placer les microtubes dans un thermocycleur et lancer la PCR à l'aide du programme du thermocycleur indiqué dans le chapitre 8.2.1 (**Tableau 2**).

> **!** Une fois la PCR terminée, les produits d'amplification doivent être utilisés immédiatement à des fins d'hybridation ou conservés à l'abri de la lumière, à -20 °C, pendant une semaine.

Tableau 3 : Préparation de la PCR Papill**oCheck**® high-risk

	1 réaction	13 réactions (1 puce)	26 réactions (2 puces)	39 réactions (3 puces)	52 réactions (4 puces)
Papill**oCheck**® **high-risk PCR MasterMix**	19,8 µl	257,4 µl	514,8 µl	772,2 µl	1029,6 µl
HotStarTaq® **polymérase (5 U/µl)**	0,2 µl	2,6 µl	5,2 µl	7,8 µl	10,4 µl
Uracil-N-glycosylase (Dilution au 1:200, 0,005 U/µl)	1 µl	13 µl	26 µl	39 µl	52 µl
Volume total avant l'ajout de l'ADN dans l'échantillon	21 µl	273 µl	546 µl	819 µl	1092 µl
ADN extrait du frottis du col de l'utérus (matrice d'ADN)	5 µl				
Volume total par réaction	26 µl				

8.3 Hybridation et lavage

8.3.1 Préparation et mise en place

L'hybridation doit être effectuée à température ambiante (20-25 °C). Commencer les préparations nécessaires pour les étapes d'hybridation et de lavage au moins 30 minutes avant de débuter la procédure d'hybridation.

- Pour dissoudre les éventuels précipités qui se sont formés dans les tampons d'hybridation et de lavage, exposer ceux-ci à la température ambiante (20-25 °C) pendant 30 minutes et bien mélanger avant utilisation.

Le stockage du kit de test Papill**oCheck**® high-risk entre 4 et 8 °C peut entraîner la précipitation de SDS dans le tampon d'hybridation et le tampon B. Laisser les solutions s'équilibrer à température ambiante, puis passer le tube au vortex ou agiter le flacon jusqu'à dissolution du précipité.

- Préparer la chambre d'hybridation oCheck® Hybridisation Chamber : Placer une serviette en papier neuve et humide dans la chambre d'hybridation et fermer le couvercle pour créer une atmosphère saturée en humidité.

Pour éviter l'évaporation du faible volume de mélange d'hybridation qui se trouve sur la puce, il est nécessaire de réaliser l'hybridation dans une atmosphère saturée en humidité. Une chambre d'hybridation dédiée à l'analyse Papill**oCheck**® high-risk est disponible auprès de Greiner Bio-One (voir le chapitre 2).

- Incuber la quantité requise de puces Papill**oCheck**® high-risk dans la chambre d'hybridation préparée à température ambiante (20-25 °C) pendant au moins 10 minutes.

> **!** Le porte-lame magnétique de la chambre d'hybridation est équipé d'un aimant à l'une de ses deux extrémités seulement. Si moins de quatre puces Papill**oCheck**® high-risk doivent être hybridées simultanément, veiller à remplir le porte-lame avec les puces Papill**oCheck**® high-risk du côté opposé à l'aimant. Sinon, les puces Papill**oCheck**® high-risk ne seront pas recouvertes de liquide au cours de la procédure de lavage.

- Préparer les solutions de lavage I, II et III conformément aux instructions suivantes.

Préparation des solutions de lavage I, II et III :

- Préparer le mélange des solutions de lavage I, II et III en fonction du nombre de puces Papill**oCheck**® high-risk analysées, comme indiqué dans le **Tableau 4**.
- Aliquoter trois volumes égaux du mélange de solution de lavage dans trois chambres de lavage oCheck® WashBoxes distinctes, et les étiqueter en tant que solutions de lavage I, II et III. Chaque chambre de lavage oCheck® WashBox contient une échelle gravée qui indique la quantité de solution de lavage nécessaire pour 4 puces au maximum. Utiliser cette échelle pour contrôler la quantité de tampon.
- Préchauffer la solution de lavage II à 50 °C dans un bain-marie à température contrôlée pendant au moins 20 minutes avant l'utilisation. S'assurer que le niveau de remplissage du bain-marie est égal à celui de la solution de lavage II.

Tableau 4 : Préparation du mélange de solution de lavage
Les volumes résumés dans ce tableau sont suffisants pour les trois étapes de lavage (solutions de lavage I, II et III) et pour le nombre indiqué de puces Papill**oCheck**® high-risk.

	Nombre de puces Papill**oCheck**® high-risk			
Composants	**1**	**2**	**3**	**4**
Eau distillée ou désionisée	140 ml	280 ml	420 ml	560 ml
Tampon A Papill**oCheck**® high-risk	14 ml	28 ml	42 ml	56 ml
Tampon B Papill**oCheck**® high-risk	1,75 ml	3,5 ml	5,25 ml	7 ml
Volume total	155,75 ml	311,50 ml	467,25 ml	623 ml

!

Ne jamais réutiliser les solutions de lavage car cela pourrait entraîner une accumulation de produit de PCR rincé pouvant potentiellement interférer avec les résultats Papill**oCheck**® high-risk. Utiliser de nouvelles solutions de lavage pour chaque dosage.

Le mélange de solution de lavage préparé peut être conservé au maximum pendant une semaine à température ambiante. Vérifier si un précipité de SDS se forme. Le cas échéant, réchauffer le mélange de solution de lavage jusqu'à dissolution du précipité et rééquilibrer à température ambiante. Ensuite, préparer l'expérience d'hybridation suivante.

8.3.2 Hybridation

L'hybridation doit être effectuée à température ambiante (20-25 °C). Les principales étapes de travail pour l'hybridation des produits de PCR pour réaliser la PCR Papill**oCheck**® high-risk sur la puce Papill**oCheck**® high-risk sont illustrées sur la **Figure 5**.

- Mélanger les produits de PCR avant utilisation. Centrifuger un court instant.

Si les produits de PCR ont été conservés à -20 °C jusqu'à l'hybridation, commencer par les décongeler avant de mélanger, puis procéder comme indiqué.

- Passer le tampon d'hybridation au vortex avant utilisation. Dégyrer un court instant.
- Mélanger **30 µl** du tampon d'hybridation Papill**oCheck**® high-risk Hybridisation Buffer dans un microtube propre d'une barrette pour PCR de 8 avec **5 µl** du produit de PCR, soit en passant au vortex soit en pipetant plusieurs fois.
- Centrifuger un court instant.
- Transférer **25 µl** du mélange d'hybridation dans chaque puits de la puce en utilisant six canaux d'une pipette multicanaux. Éviter la formation de bulles d'air !

Il est recommandé de traiter six échantillons en parallèle à l'aide d'une multi-pipette 8 canaux et de barrettes pour PCR de 8 (voir la **Figure 5**). Cela améliore l'efficacité et la rapidité de la manipulation, ce qui réduit le risque d'évaporation. Si plusieurs lames doivent être traitées en même temps, l'utilisation d'une multi-pipette est requise pour atteindre le temps d'hybridation qui convient.

Si possible, hybrider les 12 puits d'une puce. En cas de traitement de moins de 12 échantillons, laisser les puits inutilisés vides. Ces derniers ne pourront toutefois pas être utilisés ultérieurement.

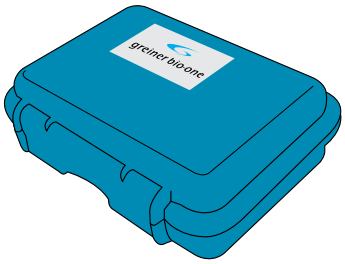
! Manipuler la puce avec soin pour éviter de déverser le mélange d'hybridation. Le déversement peut entraîner une contamination croisée des échantillons et générer des faux positifs.

Incuber la puce pendant exactement 15 minutes à température ambiante (20-25 °C) dans la chambre d'hybridation préparée, dans une atmosphère sombre et saturée en humidité. Veiller à ne pas déplacer la chambre d'hybridation pendant l'hybridation.

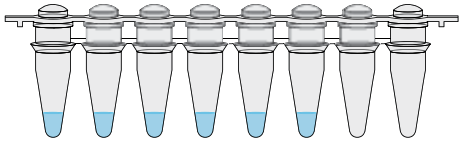
! Ne jamais modifier le temps d'incubation ni la température de la réaction d'hybridation, car cela peut provoquer une perte d'intensité du signal de fluorescence ou une hausse de la fluorescence non spécifique.

Ne pas exposer les puces hybridées à la lumière directe du soleil.

- Préparer une atmosphère saturée en humidité dans la chambre d'hybridation.
- Incuber la quantité requise de puces Papill**oCheck**® high-risk dans la chambre d'hybridation à température ambiante (20-25 °C)
(voir le chapitre 8.3.1).



- Mélanger 30 µl du tampon d'hybridation Papill**oCheck**® high-risk dans un microtube de 0,2 ml d'une barrette pour PCR avec 5 µl du produit de PCR. Bien mélanger.



- Transférer **25 µl** du mélange d'hybridation dans chaque puits de la puce Papill**oCheck**® high-risk en utilisant une pipette multicanaux.

- Fermer la chambre d'hybridation et incuber la puce Papill**oCheck**® high-risk pendant exactement **15 minutes** à température ambiante (20-25 °C).

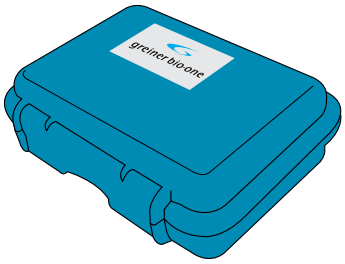


Figure 5 : Étapes de travail de la procédure d'hybridation

8.3.3 Lavage et séchage

L'équipement spécial fourni par Greiner Bio-One permet le lavage simultané de quatre puces Papill**oCheck**® high-risk au maximum (voir le chapitre 2). L'équipement supplémentaire requis pour traiter les puces Papill**oCheck**® high-risk se compose de trois chambres de lavage oCheck® WashBoxes et d'une poignée pour le porte-lame magnétique de la chambre d'hybridation.

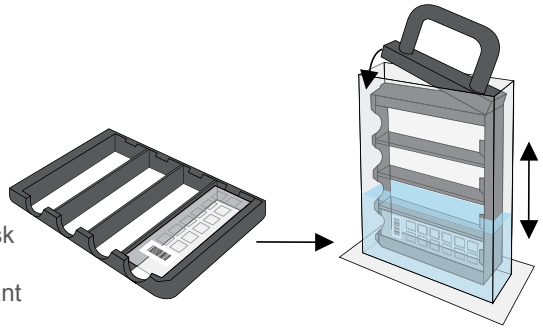
Les différentes étapes de travail sont illustrées sur la **Figure 6**.

- Retirer soigneusement le porte-lame magnétique contenant les lames hybridées de la chambre d'hybridation.
- Déposer le porte-lame contenant les lames directement dans la chambre de lavage oCheck® WashBox qui contient la solution de lavage I. Vérifier que le côté magnétique est orienté vers le haut.
- Fixer la poignée oCheck® Handle sur le porte-lame et commencer la première des trois étapes de lavage.
- Laver la puce à **température ambiante (20-25 °C)** dans la **solution de lavage I** en la déplaçant rapidement de haut en bas pendant **10 secondes**. Les puces doivent toujours rester recouvertes de solution de lavage.
- Laver la puce pendant **60 secondes** dans la **solution de lavage II** à **50 °C** en déplaçant vigoureusement le porte-lame de haut en bas.
- Laver la puce à **température ambiante (20-25 °C)** dans la **solution de lavage III** en la déplaçant rapidement de haut en bas pendant **10 secondes**.
- Eliminer **immédiatement** tout liquide de la surface de la puce par centrifugation. Si une micro-centrifugation spéciale des micro-puces est utilisée, centrifuger pendant 1 minute. Si une centrifugation pour tubes de 50 ml est utilisée, placer chaque puce Papill**oCheck**® high-risk lavée dans un tube de 50 ml et centrifuger à **température ambiante** pendant **3 minutes à 500 g**.

La puce Papill**oCheck**® high-risk est maintenant prête à être balayée immédiatement. Pour le nettoyage des chambres de lavage oCheck® WashBoxes, rincer plusieurs fois à l'eau après chaque procédure de lavage et de séchage.

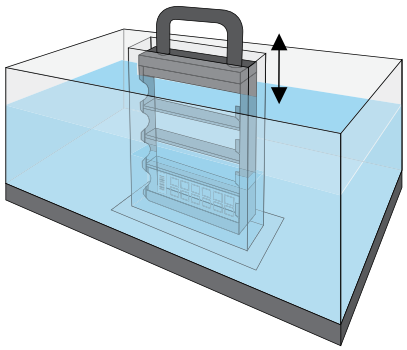
Première étape de lavage

- Retirer soigneusement le porte-lame magnétique de la chambre d'hybridation.
- Déposer rapidement le porte-lame dans la chambre de lavage oCheck® Washbox contenant la solution de lavage I.
- Fixer la poignée oCheck® Handle
- Laver la ou les puces Papill**oCheck**® high-risk dans la solution de lavage I à **température ambiante** pendant **10 secondes** en déplaçant le porte-lame de haut en bas.



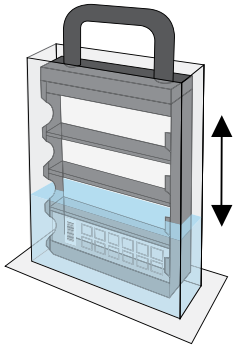
Deuxième étape de lavage

- Laver la ou les puces Papill**oCheck**® high-risk dans la solution de lavage II au bain-marie à **50 °C** pendant **60 secondes** en déplaçant le porte-lame de haut en bas.



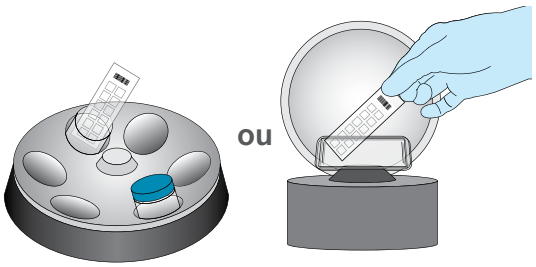
Troisième étape de lavage

- Laver la ou les puces Papill**oCheck**® high-risk dans la solution de lavage III à **température ambiante** pendant **10 secondes** en déplaçant le porte-lame de haut en bas.



Séchage

- Retirer immédiatement tout liquide de la surface des puces Papill**oCheck**® high-risk par centrifugation.



3 minutes
500 g

1 minute
Vitesse maximale

Figure 6 : Étapes de travail de la procédure de lavage
Effectuer les étapes de lavage et de séchage avant l'analyse de la puce Papill**oCheck**® high-risk à l'aide du scanner CheckScanner™ et du logiciel CheckReport™ Software.

8.4 Lecture et évaluation de la puce Papill**oCheck**® high-risk

Placer la ou les puces Papill**oCheck**® high-risk dans le scanner CheckScanner™ et procéder au balayage de la manière indiquée en détail dans le Guide de l'utilisateur du logiciel CheckReport™ Software.

Pour de plus amples informations sur l'installation du scanner CheckScanner™ et du logiciel CheckReport™ Software, ainsi que sur le système informatique requis, consulter le manuel d'utilisation du scanner CheckScanner™ et du logiciel CheckReport™ Software.

Lorsque l'analyse des données est effectuée à l'aide du logiciel CheckReport™ Software, vérifier que la version du logiciel CheckReport™ Software installée sur l'ordinateur correspond à celle indiquée sur le kit Papill**oCheck**® high-risk en cours d'utilisation. Si les versions divergent, mettre à jour le logiciel CheckReport™ Software. La dernière version du logiciel peut être téléchargée sur le site Web de Greiner Bio-One : **www.gbo.com/bioscience/biochips_download**

9. DÉPANNAGE

Si l'un des messages d'erreur suivants apparaît pendant le balayage de la puce ou si l'analyse Papill**oCheck**® high-risk échoue en raison de contrôles sur puce spécifiques, procéder comme suit. Ne pas hésiter à contacter le distributeur Greiner Bio-One local pour toute question ou difficulté liée à l'utilisation de Papill**oCheck**® high-risk.

PROBLÈME et raison	Commentaires et suggestions
MESSAGE D'ERREUR « COULD NOT READ BARCODE » (impossible de lire le code-barres)	
Code-barres endommagé	Rechercher tout dommage sur le code-barres. Saisir le code-barres à la main lorsque la fenêtre correspondante s'ouvre.
La puce a été mal chargée	Contrôler l'orientation de la puce et la balayer dans le bon sens.
MESSAGE D'ERREUR « MISSING SPOTS » PRINTING CONTROL FAILED OR ORIENTATION CONTROL FAILED (spots manquants, échec du contrôle d'impression ou d'orientation)	
Poussière sur la puce	Recommencer l'hybridation du ou des produits de PCR sur une autre puce.
Formation de bulles d'air pendant le transfert de liquide sur la puce	Recommencer l'hybridation du ou des produits de PCR sur une autre puce. Pipeter soigneusement pour éviter la formation de bulles d'air.
HYBRIDISATION CONTROL FAILED (échec du contrôle d'hybridation)	
Température incorrecte de la solution de lavage II	La seconde étape de lavage doit être effectuée à 50 °C. Vérifier que la solution de lavage II est portée à cette température.
Température incorrecte du bain-marie	La seconde étape de lavage doit être effectuée à 50 °C. Contrôler la température du bain-marie. Vérifier que le bain-marie est réglé sur une température de 50 °C. Si nécessaire, contrôler la température à l'aide d'un thermomètre.
Mauvaise préparation du mélange d'hybridation	Recommencer la préparation du mélange d'hybridation avec les volumes corrects, puis hybrider les produits de PCR sur une autre puce.

PROBLÈME et raison	Commentaires et suggestions
PCR CONTROL FAILED (échec du contrôle de PCR)	
Pas d'ajout de HotStarTaq® ADN polymérase au MasterMix	Recommencer l'analyse Papill**oCheck**® high-risk en commençant par la préparation de la PCR.
Ajout de HotStarTaq® ADN polymérase ne fonctionnant pas correctement au MasterMix	Recommencer l'analyse Papill**oCheck**® high-risk en commençant par la préparation de la PCR.
Ajout d'uracil-N-glycosylase non diluée au MasterMix	Recommencer l'analyse Papill**oCheck**® high-risk en commençant par la préparation de la PCR.
Mélange insuffisant du mélange réactionnel	Recommencer l'analyse Papill**oCheck**® high-risk en commençant par la PCR. Veiller à bien mélanger le mélange réactionnel.
Présence d'inhibiteurs de PCR dans l'échantillon	Recommencer l'extraction d'ADN et l'analyse Papill**oCheck**® high-risk.
L'hybridation a été effectuée sans ajout de produit de PCR	Recommencer l'hybridation.
Mélange insuffisant du mélange d'hybridation	Recommencer l'hybridation.
Problèmes liés au thermocycleur	Contrôler les performances du thermocycleur et sa programmation (étapes de la PCR, rampe de chaleur et volume). Attention : Utiliser le thermocycleur GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) ou Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) conjointement avec le Papill**oCheck**® high-risk.
SAMPLE CONTROL FAILED (échec du contrôle d'échantillon)	
Pas d'ajout d'ADN d'échantillon à la PCR	Recommencer l'analyse Papill**oCheck**® high-risk en commençant par la PCR.
Échec de la préparation de l'ADN	Recommencer l'extraction d'ADN.
Matériel d'échantillon insuffisant	Échec du prélèvement d'échantillon. Les échantillons sont très clairs. Les concentrer conformément à la description donnée au chapitre 9.1 et recommencer l'extraction d'ADN ou le prélèvement d'échantillon.
PCR AND/OR SAMPLE CONTROLS HAVE NOT FAILED BUT DISPLAY A SNR VALUE OF 0 (les contrôles de PCR et/ou d'échantillon n'ont pas échoué, mais affichent une valeur signal sur bruit nulle)	Ce résultat est jugé valide si le logiciel CheckReport™ Software détecte au moins un type HPV dans l'échantillon et que le signal est supérieur à un seuil défini. Le contrôle d'échantillon et/ou de PCR peut ensuite présenter des signaux de fluorescence faibles, voire nuls, en raison de la compétition qui s'est exercée au cours de la PCR.

10. ASSISTANCE TECHNIQUE

Greiner Bio-One possède un département de service technique dont le personnel est constitué de scientifiques expérimentés disposant d'un savoir-faire pratique et théorique approprié dans le domaine de la biologie moléculaire et des produits oCheck®. Pour toute question ou difficulté liée aux produits oCheck®, ne pas hésiter à contacter un distributeur Greiner Bio-One local.

11. CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE DE PAPILLOCHECK® HIGH-RISK

Papill**oCheck**® high-risk (réf. 505 060) est un kit de diagnostic à micro-puces destiné au génotypage de 14 types de HPV à haut risque. Il utilise exactement la même technologie et les mêmes composants que le kit de diagnostic Papill**oCheck**® (réf. 465 060) de Greiner Bio-One destiné au génotypage de 24 types de HPV, y compris les 14 types de HPV à haut risque que le kit Papill**oCheck**® high-risk est capable de détecter. Contrairement à Papill**oCheck**®, le kit de test Papill**oCheck**® high-risk utilise une lame à micro-puces à configuration restreinte. Le jeu de sondes déposées à la surface de la puce Papill**oCheck**® high-risk est un sous-ensemble du jeu de sondes Papill**oCheck**®.

11.1 Performance analytique de Papill**oCheck**® high-risk

11.1.1 Sensibilité analytique

La limite de détection (LoD) a été déterminée à l'aide de plasmides de référence pour chaque type HPV détectable contenant la zone E1 ciblée par Papill**oCheck**® high-risk. Les LoD sont résumées dans le **Tableau 8**.

Tableau 8 : Limites de détection des types HPV détectables

Génotype HPV	Copies / réaction	pg/ml**
HPV 16	50*	0,086
HPV 18	300*	0,516
HPV 31	300*	0,522
HPV 33	300*	0,519
HPV 35	750*	1,29
HPV 39	30*	0,052
HPV 45	50*	0,087
HPV 51	30*	0,051
HPV 52	100*	0,174
HPV 56	30*	0,052
HPV 58	150*	0,255
HPV 59	50*	0,087
HPV 66	100*	0,171
HPV 68	30*	0,052

* La concentration validée pour chaque plasmide de référence du HPV a été préparée en 2 séries de dilutions indépendantes et mesurée en 3 répétitions de la concentration testée (soit un total de 6 répétitions par concentration). En outre, chaque test contenait 10 ng d'ADN humain. En cas de variation par rapport aux données validées, les concentrations du plasmide en question ont été augmentées ou diminuées, puis testées à nouveau (6 répétitions de 2 séries de dilution indépendantes). La limite de détection correspondait à la concentration minimale où les 6 répétitions étaient positives.

** Analyse directe, sans tenir compte de la préparation de l'ADN. La quantité fait référence à l'ADN de HPV contenu dans le plasmide.

11.1.2 Spécificité analytique – Types HPV

Les plasmides de référence correspondant aux types HPV répertoriés ont été testés avec 2,12 x 10^6 copies/PCR.

HPV 6b, HPV 11, HPV 13, HPV 16, HPV 18, HPV 26, HPV 30, HPV 31, HPV 33, HPV 34, HPV 35, HPV 39, HPV 40, HPV 42, HPV 43, HPV 44, HPV 45, HPV 51, HPV 52, HPV 53, HPV 54, HPV 55, HPV 56, HPV 58, HPV 59, HPV 61, HPV 66, HPV 67, HPV 68, HPV 69, HPV 70, HPV 71, HPV 73, HPV 74, HPV 81, HPV 82, HPV 84, HPV 85, HPV 91.

Aucune hybridation croisée n'a été détectée.

11.1.3 Spécificité analytique – Organismes non HPV

Les organismes non HPV suivants ont été testés avec Papill**oCheck**® high-risk (5-10 ng d'ADN génomique). Aucun signal positif n'a été détecté.

Acinetobacter baumannii, Acinetobacter calcoaceticus, Acinetobacter lwoffii, Actinobacillus actinomycetemcomitans Serovar c, Actinomyces odontolyticus, Actinomyces viscosus, Bacillus subtilis, Bifidobacterium adolescentis, Bifidobacterium breve, Campylobacter concisus, Campylobacter gracilis, Campylobacter rectus, Candida albicans, Capnocytophaga gingivalis, Capnocytophaga ochracea, Capnocytophaga sputigena, Citrobacter amalonaticus, Citrobacter freundii, Citrobacter freundii, Citrobacter koseri, Citrobacter koseri, Clostridium difficile, Clostridium perfringens, Eikenella corrodens, Enterobacter aerogenes, Enterobacter cloacae, Enterobacter sakazakii, Enterococcus durans, Enterococcus faecali, Enterococcus faecium, Escherichia coli, Eubacterium nodatum, Fusobacterium nucleatum, Gardnerella vaginalis, Hafnia alvei, Kingella denitrificans, Klebsiella oxytoca, Klebsiella pneumoniae, Lactobacillus casei, Lactobacillus crispatus, Lactobacillus gasseri, Lactobacillus iners, Lactobacillus rhamnosus,Lactobacillus vaginalis, Mogibacterium timidum, Morganella morganii, Mycoplama hominis, Mycoplasma buccale, Mycoplasma faucium, Mycoplasma fermentans, Mycoplasma genitalium, Mycoplasma orale, Mycoplasma pirum, Mycoplasma salivrium, Mycoplosma pneumoniae, Neisseria elongata, Neisseria gonorrhoeae, Peptoniphilus asaccharolyticus, Peptostreptococcus anaerobius, Peptostreptococcus micros, Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia, Prevotella nigrescens, Proteus hauseri, Proteus mirabilis, Proteus vulgaris, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas putida, Serratia marcescens, Staphylococcus aureus ssp. aureus, Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus haemolyticus, Staphylococcus saprophyticus, Stenotrophomonas maltophilia, Streptococcus agalactiae, Streptococcus constellatus, Streptococcus criceti, Streptococcus cristatus, Streptococcus gordonii, Streptococcus intermedius, Streptococcus mitis, Streptococcus mutans, Streptococcus oralis, Streptococcus parasanguinis, Streptococcus pneumoniae, Streptococcus pyogenes, Streptococcus salivarius, Streptococcus sanguinis, Streptococcus sobrinus, Tannerella forsythensis (anciennement : Bacteroides forsythus), Treponema denticola, Ureaplasma uralyticum, Veillonella parvula.

11.2 Répétabilité

Pour évaluer la répétabilité du test, cinq échantillons contenant chacun trois modèles de référence de HPV différents, ainsi que de l'ADN génomique humain, ont été analysés avec Papill**oCheck**® high-risk. Le nombre de copies des différents HPV cibles présents dans les échantillons variait, de même que le fond d'ADN humain (voir le **Tableau 9**). Chaque échantillon a été analysé avec Papill**oCheck**® high-risk en cinq répétitions indépendantes. Ces répétitions ont été analysées par le même technicien dans les trois jours.

Tableau 9 : Composition des échantillons soumis aux tests de répétabilité

ID d'échantillon	Type HPV	Quantité d'ADN modèle	Limite de détection multipliée par X
échantillon 1	HPV 16 HPV 18 HPV 31 ADN génomique humain	180 copies 1 500 copies 1 400 copies 1 ng	3 10 30
échantillon 2	HPV 16 HPV 18 HPV 31 ADN génomique humain	180 copies 1 500 copies 1 400 copies 5 ng	3 10 30
échantillon 3	HPV 16 HPV 18 HPV 45 ADN génomique humain	1 800 copies 450 copies 300 copies 5 ng	30 3 10
échantillon 4	HPV 16 HPV 18 HPV 45 ADN génomique humain	10 000 copies 5 000 copies 20 000 copies 2,5 ng	- - - -
échantillon 5	HPV 18 HPV 31 HPV 45 ADN génomique humain	4 500 copies 500 copies 90 copies 2,5 ng	30 10 3

Pour les cinq échantillons et chaque analyse répétée, les trois types HPV corrects ont été détectés et l'analyse a été négative pour le type non inclus. Donc, 75 résultats d'analyse individuels sur 75 (5 échantillons x 5 répétitions x 4 modèles de HPV différents utilisés) étaient corrects.

11.3 Reproductibilité

La reproductibilité du kit de test Papill**oCheck**® high-risk a été déterminée à l'aide de 22 échantillons cliniques (voir le **Tableau 10**), à des concentrations de HPV proches de la limite de détection. La détermination a été effectuée selon la même méthode, avec un matériel d'échantillon identique, mais par un personnel différent, dans des laboratoires distincts et à l'aide d'une instrumentation différente. Les résultats ont été jugés concordants pour les échantillons positifs, si des types HPV identiques étaient détectés dans des infections simples ou doubles ou si deux ou trois types HPV identiques étaient détectés respectivement dans des infections multiples à trois ou quatre types de HPV, respectivement.

Tableau 10 : Résultats des tests de reproductibilité

N° d'échantillon	Résultat du laboratoire 1	Résultat du laboratoire 2	Concordance
1	HPV 33	HPV 33	+
2	HPV 35	HPV 35	+
3	négatif	négatif	+
4	HPV 45	HPV 45	+
5	HPV 51, HPV 52	HPV 51, HPV 52	+
6	HPV 51, HPV 56	HPV 51, HPV 56	+
7	HPV 16, HPV 39, HPV 68	HPV 16, HPV 39, HPV 68	+
8	HPV 39, HPV 68	HPV 39, HPV 68	+
9	HPV 16	HPV 16	+
10	négatif	négatif	+
11	HPV 56	HPV 56	+
12	négatif	négatif	+
13	HPV 18, HPV 56	HPV 18, HPV 56	+
14	HPV 51	HPV 51	+
15	HPV 58	HPV 58, HPV 68	+
16	négatif	négatif	+
17	HPV 16	HPV 16	+
18	HPV 16	HPV 16	+
19	HPV 45	HPV 45	+
20	HPV 16	HPV 16	+
21	HPV 58	HPV 58	+
22	HPV31	HPV 31	+

Les résultats concordaient pour tous les échantillons cliniques. Les signaux d'un type supplémentaire, détecté par le Laboratoire 2 pour l'échantillon 15 à infections multiples (HPV 68), étaient juste au-dessus du seuil défini. Le résultat discordant a été classé comme non problématique.

11.4 Robustesse

Les variations des paramètres suivants ont été prises en compte afin d'évaluer la robustesse du système de test Papill**oCheck**® high-risk :

- Température d'hybridation
- Durée d'hybridation
- Température de lavage
- Durée du lavage

Tous les tests ont été effectués en 3 répétitions à de fortes concentrations de modèle (1 ng de plasmide de référence de HPV ou environ 200 x 10^6 copies par échantillon). Les plages de valeurs de paramètres auxquelles une détection robuste de HPV est possible avec Papill**oCheck**® high-risk sont résumées dans le **Tableau 11**.

Tableau 11 : Robustesse de Papill**oCheck**® **high-risk**

Paramètre	Plage
Température d'hybridation	20-25 °C
Durée d'hybridation	13 à 17 minutes
Température de lavage	48-52 °C
Durée du lavage	1ère étape de lavage 10 à 15 secondes
	2ème étape de lavage 60 à 75 secondes
	3ème étape de lavage 10 à 15 secondes

11.5 Performances cliniques de PapillOCheck® high-risk

Pour déterminer les performances cliniques du test Greiner Bio-One PapillOCheck® en termes de sensibilité et de spécificité cliniques, une étude comparative a été menée à l'aide de PapillOCheck® et du test GP5+/6+-PCR EIA.[7] Pour cette étude, des échantillons provenant de 1 437 femmes représentatives de plus de 40 ans (âge moyen de 49 ans ; tranche d'âge comprise entre 40 et 60 ans) présentant une cytologie normale (groupe témoin) et 192 femmes représentatives (âge moyen de 34 ans ; tranche d'âge comprise entre 30 et 60 ans) présentant des lésions de CIN3+ confirmées histologiquement (groupe de cas) ont été analysés. Tous les échantillons utilisés dans le cadre de cette étude ont été initialement prélevés au cours de l'étape d'inclusion, sur des femmes intégrées du groupe d'intervention de l'essai randomisé et contrôlé de mise en œuvre au profit de la population POBASCAM.[8]

Après avoir limité l'analyse PapillOCheck® au 14 types de HPV haut risque ciblés par le dosage GP5+/6+-PCR-EIA et le nouveau PapillOCheck® high-risk, PapillOCheck® présentait une sensibilité clinique pour ≥ CIN3 de 95,8 % (184/192 ; IC à 95 % : 92,8-98,8) et une spécificité clinique pour ≥ CIN2 de 96,7 % (IC à 95 % : 95,7-97,7). À titre de comparaison, ces chiffres étaient respectivement de 96,4 % (185/192 ; IC à 95 % : 93,9-98,9) et 97,7 % (IC à 95 % : 96,9-98,5), respectivement, pour le test GP5+6+-PCR-EIA (voir les **Tableaux 5 et 6**).

Tableau 5 : Comparaison des résultats des analyses PapillOCheck® (14 types de HPVhr ciblés par PapillOCheck® high-risk) et GP5+/6+ PCR-EIA, stratifiés pour les témoins et les cas.

	PapillOCheck® (14 types de HPVhr)	GP5+/6+-PCR/EIA		Total
		-	+	-
Témoins	- + total	1,386 (96,5 %) 18 (1,3 %) 1,404 (97,7 %)	4 (0,3 %) 29 (2,0 %) 36 (2,3 %)	1,390 (96,7 %) 47 (3,3 %) 1,437
Cas	- + total	4 (2,1 %) 3 (1,6 %) 7 (3,6 %)	4 (2,1 %) 181 (94,3 %) 185 (96,4 %)	8 (4,2 %) 184 (95,8 %) 192

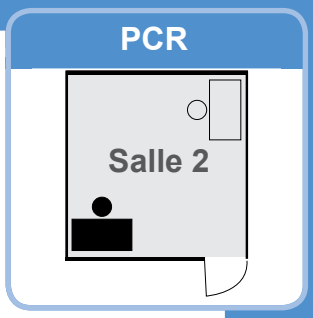
Tableau 6 : Sensibilité et spécificité cliniques de PapillOCheck® et de GP5+/6+-PCR-EIA (résultats pour un ou plusieurs des 14 types HPV haut risque - HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 et 68).

14 HPV haut risque	PapillOCheck®	GP5+/6+
Sensibilité clinique pour ≥ CIN3	95,8 %	96,4 %
Spécificité clinique pour ≥ CIN2	96,7 %	97,7 %

[7] Comparison of the clinical performance of PapillOCheck® human papillomavirus detection with that of the GP5+/6+-PCR-enzymeimmunoassayinpopulation-basedcervicalscreening.HesselinkAT,HeidemanDA,BerkhofJ,TopalF, Pol RP, Meijer CJ, Snijders PJ. J Clin Microbiol. 2010 Mar;48(3):797-801. Epub 2009 Dec 30.

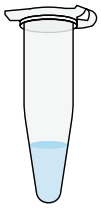
[8] Bulkmans, N. W., L. Rozendaal, P. J. Snijders, F. J. Voorhorst, A. J. Boeke, G. R. Zandwijken, F. J. van Kemenade, R. H. Verheijen, K. Groningen, M. E. Boon, H. J. Keuning, M. van Ballegooijen, A. J. van den Brule, and C. J. Meijer. 2004. POBASCAM, a population-based randomized controlled trial for implementation of high-risk HPV testing in cervical screening: design, methods and baseline data of 44,102 women. Int. J. Cancer 110:94–101.

12. RÉSUMÉ DU PROTOCOLE DE PAPILLOCHECK® HIGH-RISK



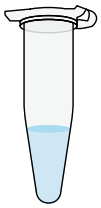
12.1 Salle 2 : PCR - Préparation du mélange réactionnel

- Diluer l'uracil-N-glycosylase dans de l'eau de qualité PCR au **1:200**.
- Mélanger soigneusement la dilution UNG



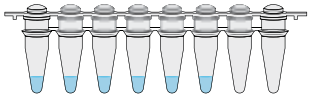
- Préparer le mélange réactionnel pour la quantité requise de PCR

	1 réaction	13 réactions (1 puce)	26 réactions (2 puces)	39 réactions (3 puces)	52 réactions (4 puces)
PapillOCheck® high-risk PCR MasterMix	19,8 µl	257,4 µl	514,8 µl	772,2 µl	1029,6 µl
HotStar Taq® Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl	2,6 µl	5,2 µl	7,8 µl	10,4 µl
Uracil-N-Glyco-sylase (Dilution au 1:200, 0.005 U/µl)	1 µl	13µl	26 µl	39 µl	52 µl
Volume total avant l'ajout de l'ADN dans l'échantillon	21 µl	273 µl	546 µl	819 µl	1092 µl



- Mélanger soigneusement le mélange réactionnel

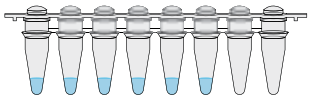
- Aliquoter le mélange réactionnel : ajouter **21 µl** du mélange réactionnel pour chaque PCR dans un microtube pour PCR de 0,2 ml d'une barrette pour PCR



RÉSORT PROTOCOLE

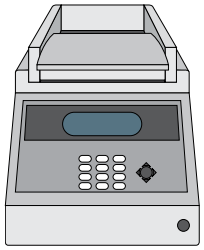
12.2 Salle 2 : PCR - Ajout de la matrice d'ADN / PCR

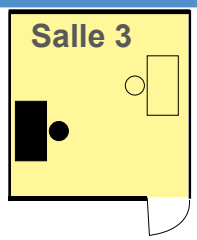
- Ajouter **5 µl** de matrice d'ADN pour chaque PCR
- Bien mélanger



- Débuter la PCR avec le programme préparé du thermocycleur

Temps	Température °C	Nombre de cycles
20 min	37 °C	1
15 min	95 °C	1
30 s 25 s 45 s	95 °C 55 °C 72 °C	40
30 s 45 s	95 °C 72 °C	15
Gel	10 °C	





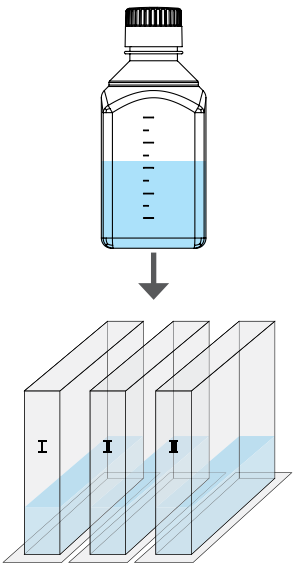
12.3 Salle 3 : Hybridation - Préparation / Réaction d'hybridation

! Commencer les préparations au moins 30 minutes avant l'hybridation.

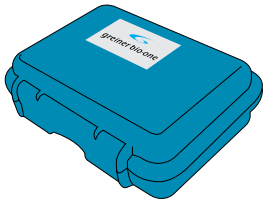
- Dissoudre les précipités qui ont pu se former dans les tampons d'hybridation et de lavage et bien mélanger
- Préparer le mélange de solution de lavage pour la quantité de puces Papill**oCheck**® high-risk à analyser.

Composants	Nombre de puces Papill**oCheck**® 1	2	3	4
Eau distillée ou désionisée	140 ml	280 ml	420 ml	560 ml
Tampon A Papill**oCheck**® high-risk	14 ml	28 ml	42 ml	56 ml
Tampon B Papill**oCheck**® high-risk	1,75 ml	3,5 ml	5,25 ml	7 ml
Volume total	155,75 ml	311,50 ml	467,25 ml	623 ml

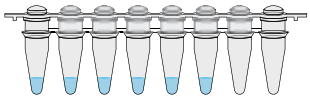
- Aliquoter le mélange de solution de lavage dans trois rigoles de lavage oCheck® WashBoxes
- Préchauffer la solution de lavage II au bain-marie à **50 °C**



- Incuber la quantité de puces Papill**oCheck**® high-risk à analyser dans la chambre d'hybridation préparée à température ambiante

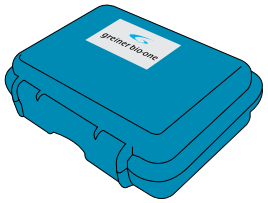


- Mélanger les produits de PCR et les dégyrer un court instant
- Mélanger le tampon d'hybridation et le dégyrer un court instant
- Mélanger **30 µl** de tampon d'hybridation Papill**oCheck**® high-risk Hybridisation Buffer avec **5 µl** de produit de PCR
- Bien mélanger et dégyrer un court instant

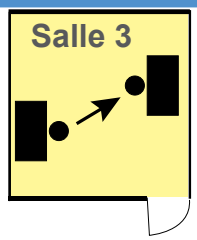


- Transférer **25 µl** de mélange d'hybridation dans chaque puits de la puce Papill**oCheck**® high-risk à l'aide d'une pipette multicanaux.
- Éviter la formation de bulles d'air

- Incuber la puce Papill**oCheck**® high-risk pendant exactement **15 minutes**, à **température ambiante (20-25 °C)**

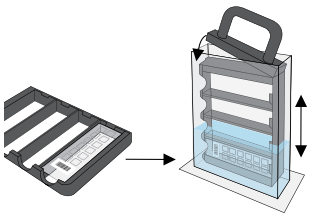


RÉSORT PROTOCOLE

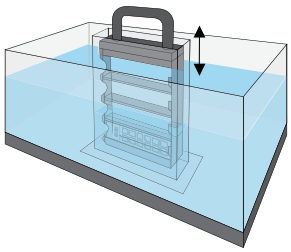


12.4 Salle 3 : Lavage et séchage / Lecture et évaluation

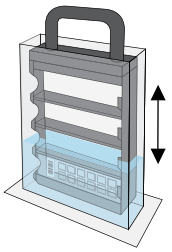
- Retirer le porte-lame magnétique de la chambre d'hybridation
- Poser le porte-lame dans la chambre de lavage oCheck® Washbox contenant la solution de lavage I
- Fixer la poignée oCheck® Handle
- Laver la ou les puces Papill**oCheck**® high-risk dans la solution de lavage I à **température ambiante** pendant **10 secondes**



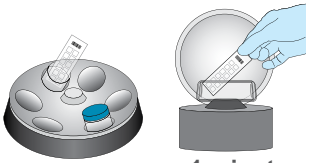
- Laver la ou les puces Papill**oCheck**® high-risk dans la solution de lavage II préchauffée au bain-marie à **50 °C** pendant **60 secondes**



- Laver la ou les puces Papill**oCheck**® high-risk dans la solution de lavage III à **température ambiante** pendant **10 secondes**



- Retirer tout liquide de la surface de la puce Papill**oCheck**® high-risk par centrifugation



3 minutes 500 g ou **1 minute Vitesse maximale**

- Lire la ou les puces Papill**oCheck**® high-risk à l'aide du scanner CheckScanner™
- Effectuer une lecture et une analyse de la manière indiquée dans le Guide de l'utilisateur du logiciel CheckReport™ Software
- Créer des rapports